Gélose de KLIGLER

DOMAINE D'UTILISATION

Le milieu de Kligler permet l'identification des entérobactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose et du glucose (avec ou sans production de gaz), ainsi que de la production de sulfure d'hydrogène.

HISTORIQUE

En 1911, Russell décrivit un milieu à deux sucres pour l'isolement de bacilles typhiques dans les urines.
Six ans plus tard, Kligler développa un milieu nutritif avec glucose, indicateur d'Andrade et acétate de plomb pour la différenciation des bactéries des groupes typhi et paratyphi. Alors qu'il expérimentait ce milieu avec d'autres combinaisons d'ingrédients, Kligler se rendit compte que le milieu de Russell, avec indicateur d'Andrade et acétate de plomb, permettait une excellente différenciation des salmonelles.
Par la suite, Bailey et Lacey préconisèrent l'utilisation de rouge de phénol comme indicateur pH, qui se substituait ainsi à l'indicateur d'Andrade, moins adapté à ce type de réaction.
Sulkin et Willett utilisèrent le thiosulfate de sodium et le sulfate ferreux pour mettre en évidence la production de sulfure d'hydrogène.

PRINCIPES

- Les fermentations du lactose et du glucose, qui permettent la différenciation des entérobactéries, se traduisent par une acidification qui fait virer au jaune le rouge de phénol (indicateur pH).
- Les microorganismes qui fermentent le glucose, mais pas le lactose (salmonelles ou shigelles), produisent initialement une pente jaune due à l'acidification obtenue par fermentation du glucose présent en faible quantité. Lorsque le glucose est complètement utilisé dans l'environnement aérobie de la pente, la réaction s'alcalinise par oxydation des acides produits, phénomène aboutissant à l'apparition d'une coloration rouge en surface. Cette alcalinisation n'apparaît pas en profondeur dans le culot, où la coloration se maintient au jaune.
- Les germes fermentant le lactose et le glucose font virer au jaune la pente et le culot par une production importante d'acide, ce qui suffit à maintenir un pH acide en surface.
- Les microorganismes ne fermentant aucun des deux glucides ne modifient pas la couleur du milieu.
- La production d'H_2S se manifeste dans le culot par l'apparition d'une coloration noire de sulfure de fer qui est due à la réduction du thiosulfate en présence de citrate ferrique.
- La production de gaz (H_2, CO_2), résultant des fermentations sucrées, se traduit par l'apparition de bulles ou bien par la fragmentation de la gélose.

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : +33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : +33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

PREPARATION

- Mettre en suspension 58,0 g de milieu déshydraté (BK034) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.
- Incliner les tubes de manière à obtenir un culot de 3 cm de hauteur et une pente oblique.

NOTA 1 :

Une liquéfaction partielle de l'agar entraînera inévitablement une altération significative de la consistance du gel du milieu solidifié, après stérilisation et refroidissement.

NOTA 2 :

Il est recommandé, lorsque le milieu n'est pas utilisé dans les 8 jours qui suivent sa préparation, de le régénérer au bain-marie bouillant et de le solidifier à nouveau en bonne position.

MODE D'EMPLOI

- A partir d'une colonie suspecte prélevée sur un milieu d'isolement sélectif, ensemencer le culot par piqûre centrale et la surface inclinée par des stries serrées.
- Il est nécessaire d'utiliser des cultures pures prélevées au centre de colonies bien isolées, sinon les réactions croisées rendent l'identification impossible à réaliser.
- Incuber à 37°C pendant 24 heures, capsules desserrées, de manière à favoriser les échanges gazeux.

LECTURE

Le milieu de Kligler fournit quatre renseignements principaux :

(1) Fermentation du glucose

- Culot rouge : glucose non fermenté
- Culot jaune : glucose fermenté

(2) Fermentation du lactose

- Pente inclinée rouge : lactose non fermenté
- Pente inclinée jaune : lactose fermenté

(3) Production de gaz

- Apparition de bulles de gaz dans le culot

(4) Formation d'H_2S

- Production d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqûre.

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : +33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : +33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

Les réactions typiques obtenues sont présentées dans le tableau suivant :

ESPECES	PENTE	CULOT		H_2S
	Lactose	Glucose	Gaz	
Salmonella Typhi [2]	-	+	-	+
Salmonella Paratyphi *A* [2]	-	+	+	-
Salmonella Choleraesuis [2]	-	+	+	-
Salmonella Pullorum [2]	-	+	+	+
Salmonella Paratyphi *B* [2]	-	+	+	+
Salmonella Typhimurium [2]	-	+	+	+
Salmonella Enteritidis [2]	-	+	+	+
Salmonella Gallinarum [2]	-	+	-	+
Shigella dysenteriae	-	+	-	-
Shigella flexneri	-	+	-	-
Shigella sonnei	-	+	-	-
Shigella boydii	-	+	-	-
Proteus vulgaris	-	+	[+]	+
Proteus mirabilis	-	+	+	+
Proteus morganii	-	+	+	-
Proteus rettgeri	-	+	-	-
Serratia marcescens	-	+	-	-
Enterobacter hafniae	-	+	+	-
Enterobacter aerogenes	+	+	+	-
Enterobacter cloacae	+	+	+	-
Escherichia coli [1]	+	+	+	-
Citrobacter freundii	+	+	+	+
Klebsiella pneumoniae	+	+	+	-
Alcaligenes faecalis	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-
Yersinia enterocolitica	-	-	-	-

[1] Certaines souches d'*Escherichia coli* ne fermentent le lactose que très tardivement.

[2] Au cas où l'interprétation peut laisser suspecter la présence de salmonelles, il est possible d'effectuer, à partir des cultures sur milieu de Kligler, la recherche de la ß-galactosidase, de l'uréase et de la lysine-décarboxylase.

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : +33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : +33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

FORMULE - TYPE

(pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales)

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone ..... 20,0 g
- Extrait autolytique de levure ..... 3,0 g
- Extrait de viande ..... 3,0 g
- Glucose ..... 1,0 g
- Lactose ..... 10,0 g
- Chlorure de sodium ..... 5,0 g
- Thiosulfate de sodium ..... 0,5 g
- Citrate ferrique ammoniacal ..... 0,5 g
- Rouge de phénol ..... 25,0 mg
- Agar agar bactériologique ..... 15,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,4 ± 0,2.

CONTRÔLE QUALITE

- Milieu déshydraté : poudre rosée, fluide et homogène.
- Milieu préparé : gélose rouge orangé.

- Réponse culturale après 24 heures d'incubation à 37°C (**XP CEN ISO/TS 11133-2**) :

Microorganismes		Croissance	Pente	Culot	H_2S	Gaz
Escherichia coli	ATCC® 25922	bonne, score 2	jaune	jaune	-	+
Escherichia coli	RIVM WR1	bonne, score 2	jaune	jaune	-	+
Citrobacter freundii	CIP 57.32T	bonne, score 2	jaune	jaune	+	+
Proteus vulgaris	ATCC 13315	bonne, score 2	rouge	jaune	[+]	-
Salmonella Enteritidis	CIP 82.97	bonne, score 2	rouge	jaune	+	+
Pseudomonas aeruginosa	CIP 82.118	bonne, score 2	rouge	rouge	-	-

- Réponse culturale de croissance après 24-48 h d'incubation à 36°C (**ISO 65340**, **NF T 90-461**) :

Microorganismes		Croissance	Pente	Culot	H_2S	Gaz
Escherichia coli	RIVM WR1	bonne	jaune	jaune	-	+
Pseudomonas aeruginosa	CIP 82.118	bonne	rouge	rouge	-	-
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 10145	bonne	rouge	rouge	-	-

STOCKAGE / CONSERVATION

Milieu déshydraté : 2-30°C.
- La date de péremption est mentionnée sur l'étiquette.
- Milieu préparé en tubes non inclinés : 6 mois à 2-8°C (à titre indicatif).
- Milieu préparé en tubes inclinés : 8 jours à 2-8°C (à titre indicatif).

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : +33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : +33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

PRESENTATION

Code

Milieu déshydraté :

- Flacon de 500 g — BK034HA

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RUSSELL, F.F.. 1911. The isolation of typhoid bacilli from urine and feces with the description of a new double sugar tube medium. J. Med. Red. Res., **25** : 217-229.

KLIGLER, I.J.. 1917. A simple medium for the differentiation of the members of the typhoid-paratyphoid group. American Journal of Public Health, **7** : 1042-1044.

KLIGLER, I.J.. 1918. Modifications of culture media used in the isolation and differentiation of typhoid, dysentery, and allied bacilli. Journal of Experimental Medicine, **28** : 319-322.

BUTTIAUX, R.. 1951. L'Analyse bactériologique des eaux de consommation. Editions médicales Flammarion, Paris.

BUTTIAUX, R., BEERENS, H., et TACQUET, A.. 1962. Manuel de techniques bactériologiques. Editions médicales Flammarion, Paris.

NF EN ISO 10273 (V 08-027). Décembre 2003. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche de *Yersinia enterocolitica* présumées pathogènes.

XP CEN ISO/TS 11133-2 (V 08-104-2). Janvier 2004. Microbiologie des aliments. Guide pour la préparation et la production des milieux de culture. Partie 2 : Guide général pour les essais de performance des milieux de culture.

XP X 33-018. Février 2004. Caractérisation des boues. Dénombrement des *Salmonella*. Méthode de dénombrement en milieu liquide (méthode du nombre le plus probable – NPP).

NF V 04-504. Mars 2006. Microbiologie des aliments. Dénombrement des *Pseudomonas* spp. dans les viandes et produits à base de viande et les volailles. Methode de routine.

NF T 90-461 (juillet 2001), NF T 90-461/A1 (juin 2005) et NF T 90-461/A2 (mai 2007). Qualité de l'eau. Contrôle qualité des milieux de culture.

NF U 47-100. Juillet 2007. Méthodes d'analyse en santé animale. Recherche par l'isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles dans l'environnement des productions animales.

NF U 47-101. Novembre 2007. Méthodes d'analyse en santé animale. Isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles chez les oiseaux.

NF U 47-102. Janvier 2008. Méthodes d'analyse en santé animale. Isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles chez les mammifères.

Les mentions portées sur les étiquettes sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document.
Les informations et les spécifications contenues dans cette fiche technique ont été établies à la date du 2010-10-13.
Elles sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.
Code document BK034/F/2001-04 : 9.

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : +33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : +33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr